



Quantificação de Sacarose em Caldo de Sorgo Sacarino por Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR)

Maria Lúcia Ferreira Simeone¹
Rafael Augusto da Costa Parrella²
Cynthia Maria Borges Damasceno³
Michelle Cristina Bastos Leal⁴
Celio Pasquini⁵

Introdução

O sorgo sacarino é uma das culturas alternativas à cana-de-açúcar mais promissoras para a produção de etanol. Apresenta ciclo médio de produção de 120 dias após a semeadura, podendo, em alguns casos, atingir o ponto adequado para a colheita em cerca de 110 dias (PARRELLA et al., 2010). O caldo do sorgo sacarino é rico em açúcares fermentescíveis, tendo como principal carboidrato a sacarose (JIA et al., 2013). Assim como para a cana-de-açúcar, uma das medidas para avaliar a qualidade do caldo de sorgo sacarino consiste em determinar o teor de sólidos solúveis (°Brix). Entretanto, o brix é uma medida indireta que relaciona o teor de sólidos solúveis dissolvidos em água baseando-se nas mudanças de índice de refração da solução. É uma medida

amplamente utilizada na qualificação tecnológica do caldo de cana (CONSELHO DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2006), suco de frutas (SERPEN, 2012), não especificando qual açúcar está presente.

Para a avaliação da composição química dos açúcares presentes no caldo de sorgo, técnicas cromatográficas são comumente empregadas, incluindo a cromatografia líquida de alta performance – CLAE (WANG et al., 2012), cromatografia iônica – CI (KUNDIYANA et al., 2010) e cromatografia gasosa – CG (LI et al., 2013), além de métodos enzimáticos (DOLCIOTTI et al., 1998). Entretanto, para todas essas técnicas existe a necessidade de preparo da amostra, utilização de produtos químicos e consumíveis, o que exige um

¹Química, D.Sc., Pesq. Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal -151, 35701-970 Sete Lagoas, MG, marialucia.simeone@embrapa.br

²Engo- Agrôn, D.Sc., Pesq. Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal -151, 35701-970 Sete Lagoas, MG, rafael.parrella@embrapa.br

³Bióloga, Ph.D., Pesq. Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal -151, 35701-970 Sete Lagoas, MG, cynthia.damasceno@embrapa.br

⁴Química, Técnica, Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, 35701-970 Sete Lagoas, MG, michelle.leal@embrapa.br

⁵Químico, Doutor em Química, Professor Titular da Unicamp, Caixa Postal 6154 -13083-970, Campinas, SP, pasquini@iqm.unicamp.br

grande trabalho de laboratório, limitando o número de amostras analisadas.

O Programa de Melhoramento de Sorgo Sacarino da Embrapa Milho e Sorgo demanda um grande número de análises de teor de sacarose em amostras de caldo de sorgo sacarino durante o período da safra. Para atender essa demanda, desenvolveu-se um método mais rápido e alternativo ao método CLAE empregado na Embrapa Milho e Sorgo.

O método escolhido utiliza a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) associada ao desenvolvimento de modelos de regressão quimiométricos multivariados. Essa abordagem tem sido amplamente utilizada em análises de alimentos (OSBORNE, 2006) e apresenta diversas vantagens sobre as técnicas tradicionais, principalmente por exigir pouca manipulação da amostra, não utilizar produtos químicos, apresentar elevada precisão e exatidão, ser de baixo custo, obtendo os resultados com rapidez (PASQUINI, 2003).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um método baseado em calibração multivariada utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo como fonte de informação analítica, visando a determinação do teor de sacarose em caldo de sorgo sacarino.

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, localizada no município de Sete Lagoas-MG em condições de campo, no ano agrícola de 2014/2015, empregando-se as cultivares de sorgo sacarino BRS 506, BRS 508, BRS 509 e BRS 511.

Para condução do experimento de campo foram mantidas práticas culturais

convencionais, de acordo com May et al. (2014).

Análise do Teor de Sacarose por CLAE

Os colmos de sorgo sacarino dos 4 genótipos avaliados foram colhidos a partir de 72 dias após o plantio, com intervalos de 7 dias até atingir os 121 dias. Em seguida, os colmos tiveram a panícula retirada e foram triturados em picador de forragem (Irbi, Araçatuba-SP, Brasil). Desse material triturado, 500 g foram levados à prensa hidráulica (Hidraseme, Ribeirão Preto-SP, Brasil) por 1 minuto com pressão mínima e constante de 250 kgf.cm². Do caldo extraído de cada amostra, retirou-se uma alíquota de 80 mL, a qual foi armazenada em frasco de polietileno e congelada a -4 °C para posterior análise, totalizando 93 amostras, sendo que, três amostras foram perdidas durante o processamento. Para a realização da análise do teor de sacarose por CLAE, as amostras de caldo de sorgo foram descongeladas em temperatura ambiente, sendo 3 mL de cada amostra diluídos 15 vezes com água deionizada. Em seguida, as amostras foram agitadas a 45 rpm por 15 minutos e centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos. Na sequência, as amostras foram filtradas em cartuchos C18, previamente condicionados com 2 mL de acetonitrila 99,8% (v/v) grau HPLC e 2 mL de água deionizada. Após a realização desse processo, 2 mL da solução diluída foram filtrados em membranas PTFE de 0,45 µm e transferidos para frascos com capacidade para 2 mL, que foram acondicionados no carrossel do cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters 2695 Alliance, Milford MA, USA). Em seguida, foram injetados 25 µL de cada amostra em uma coluna Phenomenex (RCM-Ca). A fase móvel utilizada foi água ultrapura com fluxo 0,6 mL/min e temperatura da coluna igual a 65 °C. O detector utilizado foi índice de refração (Milford MA, USA) a 40 °C. Para a construção da curva analítica foi utilizada sacarose da

marca Sigma com grau de pureza de 99,5% (m/m). A detecção da sacarose nas amostras foi realizada por CLAE pela comparação com o tempo de retenção do padrão.

Obtenção dos Espectros NIR e Análise Multivariada

As amostras de caldo de sorgo sacarino foram filtradas em algodão para retirar sólidos suspensos maiores que 0,5 mm. Para a realização da leitura dos espectros no equipamento FT-NIR, as amostras de caldo foram adicionadas em placas de Petri de vidro borossilicato com o acessório de transflectância e levadas ao equipamento NIR, marca BUCHI, modelo NIRFlex 500 (Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland), para a coleta dos espectros. O equipamento foi calibrado utilizando o padrão Spectralon® (LABSPHERE, 2015) e os espectros das amostras de caldo de sorgo sacarino foram obtidos na região 1.000-2.500 nm (10.000 a 4.000 cm^{-1}), com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras por espectro.

O software Uncrambler® X (versão 10.2, CAMO Software Inc., Norway) foi utilizado para todos os pré-processamentos dos dados e calibração multivariada. Utilizou-se o método dos mínimos quadrados parciais – PLS (do inglês – *Partial Least Square*) para a construção do modelo, e para avaliação de seu desempenho foram utilizados os seguintes parâmetros estatísticos: raiz quadrada do erro médio de calibração - RMSEC (do inglês – *Root Mean Squared Error of Calibration* –), raiz quadrada do erro médio de validação cruzada - RMSECV (do inglês – *Root Mean Squared Error of Cross Validation*), raiz quadrada do erro médio de predição - RMSEP (do inglês – *Root Mean Squared Error of Prediction*), R^2 (coeficiente de determinação para o conjunto de calibração e validação), razão de intervalo de erro – RER (do inglês – *Range Error Ratio*) e relação de desempenho do desvio - RPD (do

inglês – *Residual Prediction Deviation*) (NIRS CONSORTIUM, 2008).

Também foi realizada a análise de variância – ANOVA a 5% de probabilidade para comparação de variâncias entre os resultados obtidos pelos dois métodos (FERREIRA, 2008).

Resultados

Nas 93 amostras de caldo de sorgo sacarino analisadas por CLAE, a concentração de sacarose variou entre 1,74 e 15,37% (m/v), representando assim as diferentes etapas de maturidade dos colmos. Para a construção do modelo, as amostras de caldo de sorgo sacarino foram organizadas em ordem decrescente da concentração de sacarose e foram separadas em dois conjuntos, um de calibração contendo aproximadamente 2/3 das amostras e um para a validação externa contendo 1/3 das amostras. Dessa forma, as amostras foram classificadas em dois conjuntos (calibração e validação externa), cobrindo toda a faixa de concentração da sacarose presente nas amostras.

Todos os espectros NIR das amostras de caldo de sorgo sacarino (Figura 1) foram pré-processados utilizando a variação normal padrão (SNV – do inglês *Standard Normal Variate*), primeira derivada Savitzky-Golay com 9 pontos à direita e 9 pontos à esquerda para corrigir os efeitos de espalhamento e deslocamentos de linha de base. Os dados foram centrados na média.

Nos espectros, podemos observar um pico forte de absorção de água em 6.900 cm^{-1} , referente ao primeiro sobreton OH e outro em 5.200 cm^{-1} , referente a uma banda de combinação de OH, para todas as amostras analisadas (Figura 1). Uma região rica em informação a partir de 4.600 a 4.000 cm^{-1} pode ser atribuída a combinações de estiramento de OH/ligação de hidrogênio, C-C estiramento 4.393 cm^{-1} e combinações de C-H/C-C (4.382-

4.063 cm^{-1}) características das moléculas de açúcares (OSBORNE; DOUGLAS, 1981).

O coeficiente de determinação (R^2) obtido para o conjunto de amostras da calibração foi 0,96 e para a validação cruzada, 0,95, sugerindo,

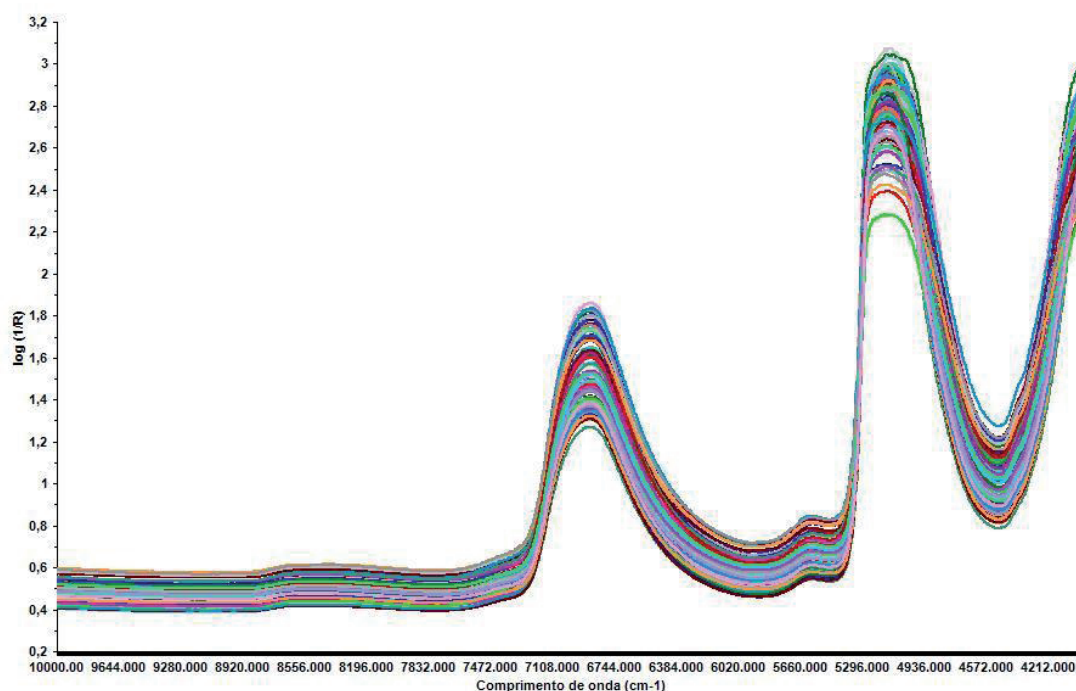


Figura 1. Espectros NIR originais das amostras de caldo de sorgo sacarino.

Os valores obtidos pelo método de referência para o teor de sacarose em caldo de sorgo foram associados aos dados espectrais, e o modelo de calibração multivariada foi desenvolvido utilizando o método PLS. A escolha do melhor modelo de regressão baseou-se na análise do menor erro padrão, associado à calibração e validação e do coeficiente de determinação (R^2) entre os resultados do método de referência e aqueles previstos pelo modelo.

A escolha do número de variáveis latentes foi feita por meio da resposta de maior variância explicada e o menor valor de RMSECV. Os escores e o peso de cada modelo também foram analisados, sendo que o melhor resultado foi obtido com o uso de 5 variáveis latentes.

Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 1.

portanto, que há uma boa correlação entre os valores previstos pelo modelo multivariado e os valores obtidos pelo método de referência. A eficiência do modelo foi avaliada pela previsão de resultados para novas amostras de caldo de sorgo. Nesta etapa, foram usadas 29 amostras externas à etapa de calibração e o erro associado ao modelo desenvolvido pode ser avaliado pelo RMSEP. O erro padrão de predição encontrado foi de 0,74% com um coeficiente de determinação R^2 de 0,93. O valor encontrado para RMSEP está muito próximo do valor encontrado para RMSEC.

Chen et al. (2014) utilizaram amostras secas e moídas de biomassa de sorgo sacarino para a construção de um modelo de regressão multivariado para predição do teor de sacarose e obtiveram um RMSEP de 1,77%, mais que o dobro do valor de RMSEP encontrado neste trabalho, (0,74%), além de

utilizarem um preparo de amostra muito mais demorado e trabalhoso.

No caso, o modelo para determinação de sacarose em caldo de sorgo sacarino

Tabela 1. Resultados das análises estatísticas dos conjuntos de calibração e validação para o teor de sacarose em caldo de sorgo sacarino.

Parâmetros	Calibração	Validação cruzada	Previsão
Número de amostras	64	64	29
Faixa espectral (cm ⁻¹)	4.000-10.000	4.000-10.000	4.000-10.000
Valor máximo (%)	15,37	15,37	14,04
Valor mínimo (%)	1,74	1,74	3,47
Média (%)	6,92	6,92	7,25
Variáveis Latentes	5	5	5
R ²	0,96	0,95	0,93
RMSE*(%)	0,57	0,67	0,74
RPD	4,62	4,41	3,98
RER	23,9	19,79	15,06

*RMSEC: calibração; RMSECV: validação cruzada; RMSEP; previsão.

Na Figura 2 são apresentados os valores obtidos para o teor de sacarose utilizando o método CLAE versus os valores preditos com base no modelo de regressão multivariado.

Podemos observar que o modelo PLS obteve resultados para o teor de sacarose que se mostraram distribuídos de forma aleatória em relação aos resultados obtidos pelo método de referência em torno da bissetriz, mostrando, assim, desempenho adequado.

O método AACC 39-00.01 (AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS, 1999) fornece limiares de qualidade para o desempenho do modelo com base nos valores de RER: para um $RER \geq 4$, a calibração é aceitável para seleção de amostras; para um $RER \geq 10$, a calibração é aceitável para o controle de qualidade; e um $RER \geq 15$, a calibração é adequada para a quantificação.

obteve um RER de 15,09 sendo considerado adequado para utilização em quantificação.

A RPD também é uma medida utilizada para estimar a capacidade preditiva dos modelos, na qual se devem utilizar modelos com RPD acima de 1,5. O valor de RPD representa a relação entre o desvio padrão dos valores da propriedade medida pelo método convencional e o erro padrão das amostras contidas no conjunto de calibração ou previsão (WILLIAMS; SOBERING, 1993). Como podem ser observados na Tabela 1, os valores de RPD para sacarose foram considerados bons, uma vez que os valores obtidos foram 4,62 e 3,98 para calibração e previsão, respectivamente. Esses valores indicam que o erro de estimativa da concentração de sacarose é muito menor que o desvio padrão das amostras.

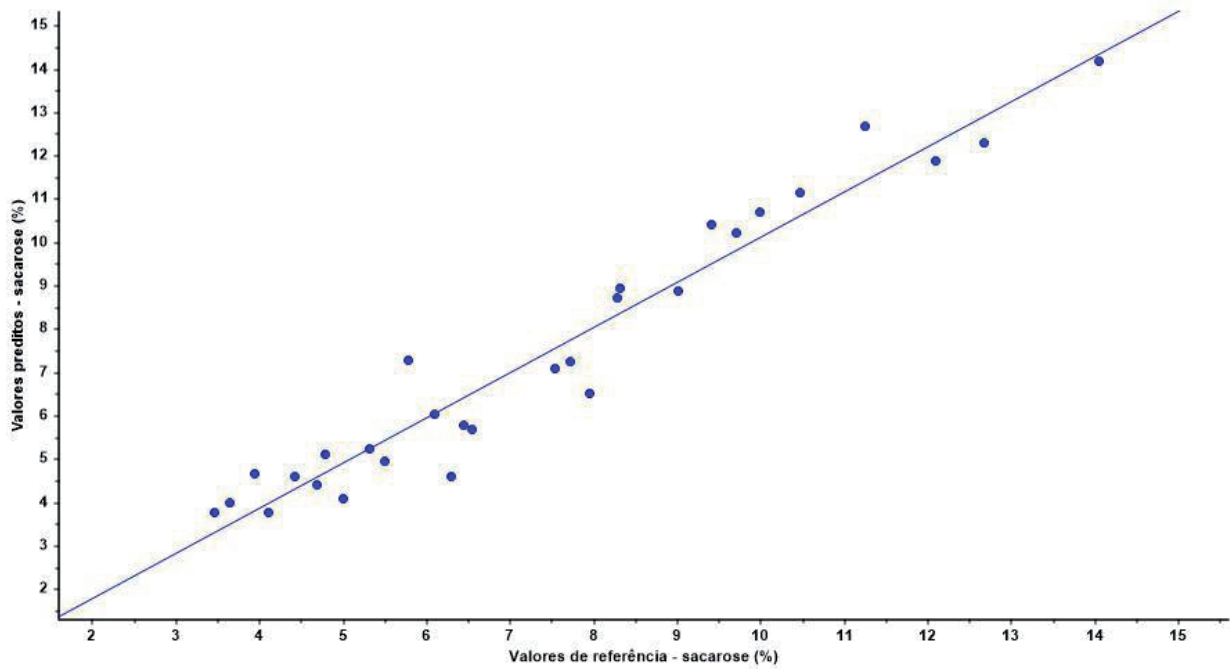


Figura 2. Valores de referência *versus* valores preditos para teor de sacarose em caldo de sorgo sacarino (validação externa).

Os métodos PLS-NIR e CLAE foram comparados pelo teste F para verificar se há diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos dois métodos (Tabela 2).

valores encontrados para o teor de sacarose, tanto pelo método cromatográfico quanto pelo modelo PLS-NIR apresentaram resultados equivalentes.

Tabela 2. Comparação das variâncias do modelo PLS-NIR e do método CLAE usados para análise de sacarose em caldo de sorgo sacarino.

Parâmetro	Número de amostras	F calculado	F crítico	Intervalo (%) m/v	
				CLAE	NIR
Sacarose	29	1,15	4,01	3,47 a 14,04	3,75 a 14,16

*significativo quando $F_{calc} > F_{crit, GL}$ (1,56).

A ANOVA mostrou que não se pode afirmar que há diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dois métodos. O F calculado foi menor que o tabelado, indicando que os dois métodos não diferem estatisticamente (Tabela 2). Os

Com o modelo desenvolvido para análise de sacarose em caldo de sorgo será possível analisar em média 100 amostras por dia, enquanto pelo método cromatográfico

são analisadas em torno de 12 amostras diariamente.

Para manter a qualidade dos resultados e também no intuito de melhorar as correlações já obtidas, deve-se complementar o banco de dados com novos espectros de amostras de caldo a cada safra de sorgo sacarino visando ampliar os intervalos de concentração de sacarose e manter o modelo sempre atualizado.

Conclusão

O uso da espectroscopia no infravermelho próximo associada a métodos de calibração multivariada possibilitou o desenvolvimento de um método rápido e não destrutivo para análise do teor de sacarose em caldo de sorgo sacarino. Os resultados indicam que o modelo de calibração multivariada PLS-NIR foi capaz de fornecer resultados confiáveis e que possibilitam a realização de um grande número de amostras por dia, tornando possível a sua implantação em rotina laboratorial.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPEMIG pela manutenção do equipamento de HPLC e ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Avançadas - INCTAA pela oportunidade de capacitação em espectroscopia no infravermelho próximo.

Referências

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS - AACC. **Near-infrared methods: guidelines for model development and maintenance: AACC method 39-00.** Saint Paul, 1999.

CHEN, S.; DANAIO, M. G. C.; SINGH, V.; BROWN, P. J. Determining sucrose and glucose levels in dual-purpose sorghum stalks

by Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, n. 94, p. 2569-2576, 2014.

CONSELHO DOS PRODUTORES DE CANA-DE-AÇÚCAR, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CONSECANA. **Normas operacionais de avaliação da qualidade da cana-de-açúcar.** 5. ed. Piracicaba, 2006. Disponível em: <http://www.orplana.com.br/manual_2006.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2015.

DOLCIOTTI, I.; MAMBELLI, S.; GRANDI, S.; VENTURI, G. Comparison of two sorghum genotypes for sugar and fiber production. **Industrial Crops and Products**, v. 7, n. 2/3, p. 265-272, 1998.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

JIA, F.; CHAWHUAYMAK, J.; RILEY, M. R.; ZIMM, W.; OGDEN, K. Efficient extraction method to collect sugar from sweet sorghum. **Journal of Biological Engineering**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2013.

KUNDIYANA, D. K.; BELLMER, D. D.; HUHNKE, R. L.; WILKINS, M. R.; CLAYPOOL, P. L. Influence of temperature, pH and yeast on in-field production of ethanol from unsterilized sweet sorghum juice. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 34, p. 1481-1486, 2010.

LABSPHERE® **Technical guide:** reflectance materials and coatings. North Sutton, 2015. Disponível em: <<https://www.labsphere.com/site/assets/files/2553/a-guide-to-reflectance-materials-and-coatings.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2015.

LI, J.; LI, S.; HAN, B.; YU, M.; LI, G.; JIANG, Y. A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet

sorghum stalks into ethanol. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 174-186, 2013.

MAY, A.; PARRELLA, R. A. da C.; DAMASCENO, C. M. B.; SIMEONE, M. L. F. Sorgo como matéria-prima para produção de bioenergia: etanol e cogeração. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, n. 278, p. 14-20, 2014.

NIRS CONSORTIUM. **White paper, near infrared spectroscopy for forage and feed testing**. Hillsboro, 2008. Disponível em:

<<http://nirsconsortium.org/Resources/Documents/NIRS%20white%20paperMar09.pdf>> Acesso em: 23 ago. 2015.

OSBORNE, B. G. **Near-infrared spectroscopy in food analysis**. New York: John Wiley & Sons, 2006. (Encyclopedia of Analytical Chemistry).

OSBORNE, B. G.; DOUGLAS, S. Measurement of the degree of starch damage in flour by near infrared reflectance analysis. **Journal Science Food Agriculture**, v. 32, p. 328-332, 1981.

PARRELLA, R. A. da C.; RODRIGUES, J. A. dos S.; TARDIN, F. D.; DAMASCENO, C. M. B.; SCHAFFERT, R. E. **Desenvolvimento de híbridos de sorgo sensíveis ao fotoperíodo visando alta produtividade de biomassa**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 25 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 28).

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 198-219, 2003.

SERPEN, J. Y. Comparison of sugar content in bottled 100% fruit juice versus extracted juice of fresh fruit. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 1509-1513, 2012.

WANG, M.; XIN, Z.; TONNIS, B.; FARRELL, G.; PINNOW, D.; CHEN, Z.; DAVIS, J.; YU, J.; HUNG, Y.; PEDERSON, G. A. Evaluation of sweet sorghum as a feedstock by multiple harvests for sustainable bioenergy production. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v. 2, p. 122-137, 2012.

WILLIAMS, P. C.; SOBERING, D. C. Comparison of commercial Near-Infrared Transmittance and Reflectance Instruments for analysis of whole grains and seeds. **Journal Near Infrared Spectroscopy**, Sussex, v. 1, p. 25-32, 1993.

Comunicado Técnico, 212

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
www.embrapa.br/fale-conosco
1ª edição
Versão Eletrônica (2015)

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Sidney Netto Parentoni.
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau.
Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso Campanha, Roberto dos Santos Trindade e Rosângela Lacerda de Castro.
Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros.
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro.
Tratamento das ilustrações: Tânia Mara A. Barbosa.
Editoração eletrônica: Tânia Mara A. Barbosa.

Expediente